ПАРАЗИТОЛОГИЯ, VII, 2, 1973

УДК 576.895.772

ПРОНИЦАЕМОСТЬ ПОКРОВОВ ЛИЧИНОК I СТАДИИ HYPODERMA BOVIS DE GEER ДЛЯ АМИНОКИСЛОТ, МЕЧЕННЫХ РАДИОАКТИВНЫМИ ИЗОТОПАМИ

В. З. Белинская

Зоологический институт АН СССР, Ленинград

Покровы личинок I стадии подкожного овода *Hypoderma bovis* De Geer обладают определенной степенью проницаемости, в частности для аминокислот — глицина, лейцина и метионина. Характер накопления радиоактивной метки указывает на избирательность распределения изучаемых аминокислот. Содержимое средней кишки личинок I стадии обладает кумулятивным свойством.

Способ питания личинок I стадии подкожных оводов остается до сих пор нерешенным вопросом. Данные литературы по этому вопросу отсутствуют. Однако выяснение механизма питания личинок в организме хозяина является краеугольным камнем для понимания хозяино-паразитных отношений.

A priori предполагается, что у личинок подкожного овода, как и у личинок ближайших родственных двукрылых — миазных мух, экстраинтестинальное пищеварение. При культивировании личинок I стадии *H. bovis* нами было обнаружено окрашивание их покровов и гемолимфы феноловым красным (М-270), добавленным в питательную среду в качестве индикатора. Это позволило предположить, что покровы личинок обладают определенной степенью проницаемости для различных веществ, в том числе и питательных.

Чемберлен (Chamberlain, 1969) в опытах с меченым фосфором P^{32} показал, что последний легко проникает через покровы личинок I стадии *H. bovis*. Проблема проницаемости хитиновой кутикулы разрабатывается последние 40 лет советскими и иностранными авторами (Александров, 1934; Морозов, 1935; Ильинская, 1946; Скворцов, 1946; Овчинникова, 1960; Wigglesworth, 1945; Dennell, 1947).

Чтобы определить степень проницаемости покровов личинок I стадии *H. bovis*, мы предприняли ряд серий опытов с мечеными аминокислотами и попытались проследить путь последних в организме личинки.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Личинок I стадии *H. bovis* получали на Ленмясокомбинате на конвейере, из эпидуральной ткани позвоночных каналов молодняка крупного рогатого скота. Личинок доставляли на холоду в лабораторию, где тщательно отмывали от обрывков ткани хозяина в физиологическом растворе (2—3 порции). В последнюю порцию добавляли антибиотики из расчета 50 ЕД пенициллина и 50 ЕД стрептомицина на 1 мл раствора. Затем личинок помещали в среду следующего состава: среда 199 — 100 мл, гидролизат лактальбумина — 10 мл, сыворотка телячья — 5 мл, антибиотики (пенициллин и стрептомицин) — по 50 ЕД/мл.

Указанная порция среды была достаточной для 10—15 личинок. Их содержали при 38.5—39° в термостате. Время предварительного содержания составляло 24 часа.

Ставили три серии опытов. В первой серии личинок извлекали из чистой среды и переносили в среду, содержащую аминокислоты — глицин и лейцин, меченные по C^{14} в концентрации 5 μCu/мл среды и метионин, меченный по S^{35} в концентрации 20 μCu/мл среды. Личинок в среде, содержащей изотопы, экспонировали от 30 мин. до 24 час. с интервалами: лейцин — 30 мин., 2, 6, 9, 24 час.; глицин — 30 мин., 1, 2, 3, 4, 9, 24 час.; метионин — 1, 3, 6, 24 час. По истечении срока экспозиции личинок извлекали из среды, содержащей изотоп, и тщательно отмывали до тех пор, пока счетчик радиоактивности не переставал ее фиксировать. Затем личинок препаровали, выделяя отдельно покровы, гемолимфу, среднюю кишку с содержимым. Отпрепарованные части тщательно высушивали под кварцевой лампой и производили измерение радиоактивности на радиометрическом счетчике Б-2 каждой части исследуемой личинки трижды по 1 мин. Данные суммировали, определяли среднюю арифметическую, затем пересчитывали на количество импульсов в секунду, получая величину относительной активности.

Вес исследуемых частей личинок составил: гемолимфа — 0.0006 г $\pm$ $\pm 0.0^{5}15$, средняя кишка с содержимым — 0.0046 г $\pm 0.0^{4}923$, покровы — 0.0051 г $\pm 0.0^{4}103$.

Величина относительной активности перечислялась на единицу веса (1 мг) для определения удельной активности.

Во второй серии опытов личинок экспонировали в среде, содержащей глицин C^{14} и метионин S^{35} по 5 μCu/мл, в течение 48 час. Затем переносили в чистую среду и отмывали в последней в течение 1, 3, 6 и 24 час. Третья серия заключалась в том, что в течение 30 мин. личинок содержали в среде в лейцином C^{14} (5 μCu/мл), а затем в течение 15, 30 мин., 1, 3, 6, 24 час. отмывали в чистой среде.

Обработка, содержание, препаровка и определение радиоактивности были такими же, как описано выше. В каждой серии опытов использованы 32 личинки.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Из рис. 1—5 видно, как меченые аминокислоты распределяются в исследуемых тканях личинок.

В первой серии опытов уже через 30 мин. экспозиции отмечается высокий уровень активности в гемолимфе, меньше в покровах и совсем незначительный уровень в средней кишке (рис. 1—3). По мере увеличения времени экспозиции в радиоактивной среде, содержащей метионин S^{35} и лейцин C^{14}, накопление метки происходило пропорционально времени (рис. 1, 3). По мере распределения метки отмечаются некоторые амплитуды активности. Это наиболее характерно для лейцина C^{14} (особенно в гемолимфе). Так, к 9 час. экспозиции наблюдаем спад активности в гемолимфе и покровах, с одновременным некоторым увеличением ее в средней кишке. 24 час. экспозиции обнаруживают стабилизацию активности в гемолимфе, тогда как последняя в покровах превышает исходную в 2, а в средней кишке в 10 раз.

Метионин S^{35} накапливается во всех исследуемых органах и тканях строго прямо пропорционально времени экспозиции, причем активность в гемолимфе резко выше активности в покровах и средней кишке (рис. 3). Напротив, глицин C^{14}, который в начале экспозиции (30 мин.) ведет себя подобно метионину S^{35} и лейцину C^{14}, с увеличением времени экспозиции наряду с накоплением метки в средней кишке и стабилизацией ее в покровах обнаруживает резкие колебания активности в гемолимфе и к 24 час. активность в гемолимфе снижается в 3 раза по сравнению с величиной, характерной для 30-минутной экспозиции (рис. 2).

Во второй серии опытов, когда объекты выдерживали в радиоактивной среде в течение 48 час., а затем отмывали в чистой среде с интервалами

1, 3, 6, 24 часа, вымывание метки происходило пропорционально времени, однако неодинаково из различных исследуемых частей личинки. Если из гемолимфы и покровов выведение шло сравнительно быстро, то в средней кишке активность была более стабильной. Так, к 24 час. отмывания от метки метионина S^{35} радиация в гемолимфе снизилась ≈ в 3.5, в покровах ≈ в 5, в средней кишке ≈ в 1.5 раза. Ту же закономерность наблюдаем и в опытах с глицином C^{14}. Следует при этом заметить, что через 1 час после начала отмывания в опыте с глицином C^{14} отмечается неожиданный пик активности в гемолимфе, покровах и средней кишке, а также в покровах и средней кишке личинок из опыта с метионином S^{35}. Затем освобождение от метки соответствовало времени экспозиции. В гемолимфе личинок, содержавшихся в среде с метионином S^{35}, отмечены резкие колебания. Через час активность в гемолимфе снизилась ≈ в 9 раз по сравнению с исходной (рис. 4).

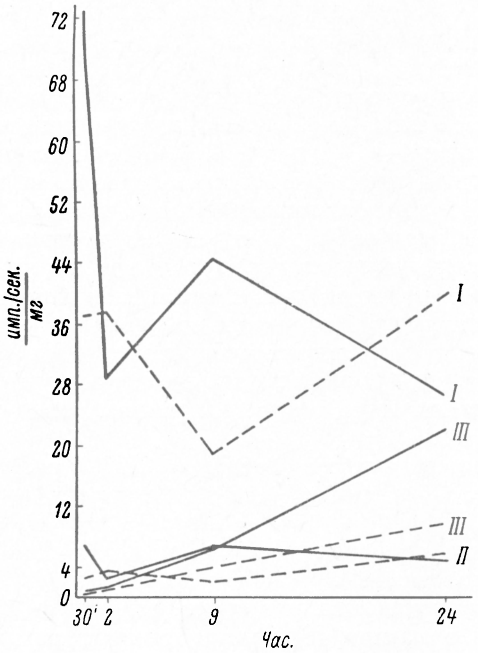

Рис. 1. Распределение глицина C^{14} и лейцина C^{14} (экспозиция до 24 час.).

Сплошная линия — глицин C^{14}, *прерывистая* — лейцин C^{14}. *По оси ординат* — удельная активность; *по оси абсцисс* — время экспозиции в радиоактивном изотопе. *I* — гемолимфа; *II* — покровы; *III* — средняя кишка с содержимым.

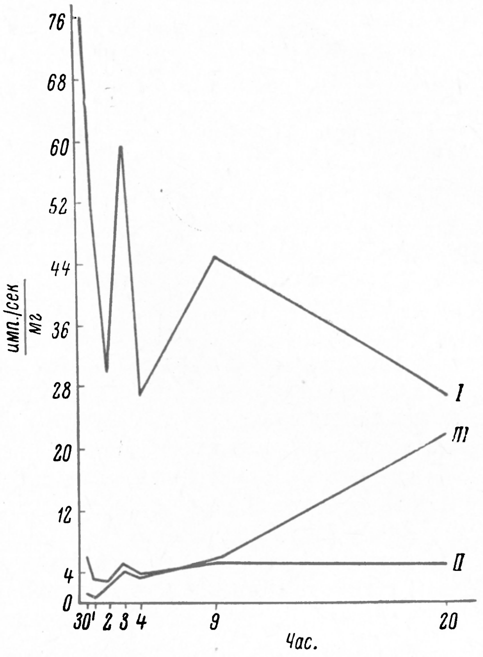

Рис. 2. Распределение глицина C^{14} (экспозиция от 30 мин. до 24 час.).

Обозначения те же, что и на рис. 1.

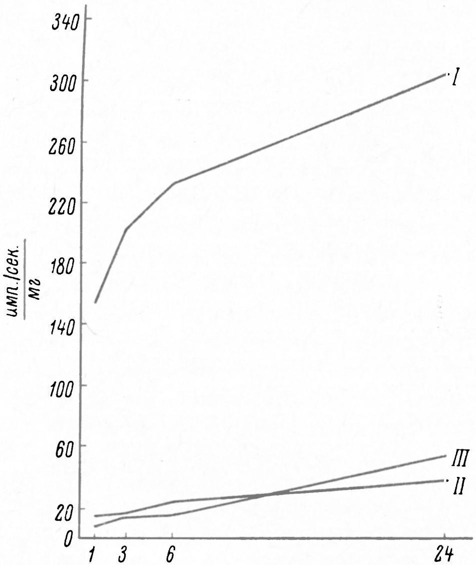

Рис. 3. Распределение метионина S^{35} (экспозиция 1—24 час.).

Обозначения те же, что и на рис. 1.

Третья серия опытов (рис. 5) имела целью проследить путь метки лейцина C^{14} (5 μCu/мл) после экспозиции в течение 30 мин. и при последующем содержании личинок в среде, лишенной изотопа.

Как видно из рис. 5, наибольшая активность наблюдается в гемолимфе, меньше — в покровах и очень незначительна — в средней кишке. Через

15 мин. отмывания в чистой среде отмечается пик активности в гемолимфе и покровах, тогда как последний в средней кишке регистрируется через 30 мин. Затем выведение метки из исследуемых органов и тканей происходило пропорционально времени отмывания. К 24 час. личинки полностью освобождались от радиации.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные данные позволяют предположить, что ряд веществ, в том числе и питательных, могут проникать в организм личинок I стадии через покровы.

Для осуществления экстраинтестинального пищеварения личинка должна выделить в окружающую среду определенный набор ферментов с тем, чтобы расщепить субстрат и затем поглотить полученную жидкую кашицу. Подобное течение процесса in vivo можно себе представить, но как тогда объяснить способность личинок жить in vitro в жидкой среде (в наших опытах до 1 мес., а в опытах Бисли (Beesley, 1966) — более 3 мес. Ферменты, выделенные личинкой в жидкую среду, мгновенно растворятся в ней и схема внекишечного пищеварения замкнется на этом этапе. Но личинки in vitro живут, сохраняют тургор, некоторые экземпляры даже линяют (Beesley, 1966).

Остается предположить, что, если внекишечное пищеварение и имеет место, то наряду с ним личинки могут получать питательные вещества и иным путем — через покровы. Какая доля в питании личинок I стадии приходится на этот способ мы не знаем, но не принимать это обстоятельство во внимание нельзя. В защиту этого предположения говорит ряд фактов. Прежде всего исследователи при изучении миграции личинок I стадии не обнаруживали следов растворения тканей перед личинкой (Brauer, 1963; Бреев, 1967). Покоясь в эпидуральной ткани хозяина, живая личинка *H. bovis* не оставляет в ней следов своей деятельности. Высказано предположение, что личинка в процессе жизнедеятельности и миграции оставляет след в виде зеленоватых выделений (Ruser, 1895; Koorevaar, 1899; Gebauer, 1941; Wolfe, 1959), и многие исследователи пытались обнаружить личинок в тканях именно по этому признаку.

Бреев (1967) предостерегает от такого рода ошибок. Мы при многочисленных вскрытиях обнаруживали такие следы только на месте погибших личинок. Изменения в тканях наступают позже, когда личинки в конце миграции идут под кожу. Тогда могут отмечаться и сильные кровоизлияния и зеленый цвет ткани на месте погибших личинок (здесь происходит опорожнение кишечника и зеленоватый его секрет изливается наружу).

Кроме того следует более внимательно присмотреться к тем условиям, в которых личинки I стадии совершают миграцию, а затем покоятся в ожидании первой линьки. Как известно, кровеносные сосуды (капилляры) приносят ко всем органам и тканям организма расщепленные продукты обмена веществ. Личинки I стадии мигрируя вдоль нервно-сосудистых пучков, а затем, оставаясь в эпидуральной ткани позвоночного канала (*H. bovis*) или в подслизистой пищевода (*H. lineatum*), или в подкожной клетчатке (*O. tarandi*), омываются тканевой жидкостью, содержащей в растворенном состоянии все необходимые компоненты питания. Далее хитиновый покров, как бы гомогенно визуально он не выглядел, обладает, однако, проницаемостью (Александров, 1935; Скворцов, 1946; Овчинникова, 1960). Не исключено это и в нашем случае. Некоторые попытки для выяснения проницаемости хитина при осмотических процессах предпринимались (Eidmann, 1922). Результат был получен положительный, но, к сожалению, автор ограничился исследованиями проницаемости хитина, выстилающего переднюю кишку, оставив без внимания хитин покровов. В решении этого вопроса большую помощь могут оказать электронная микроскопия покровов и ряд гистохимических анализов. Еник и Пфаф (Enigk u. Pfaff, 1954) исследовали с помощью электронного микроскопа кутикулу личинок II и III стадии *H. bovis* и обнаружили в ней вертикальные поровые канальцы. Кеноф (Kennaugh, 1965) этим же методом выявил спиралевидные поровые каналы кутикулы *H. bovis*. Растворимые в тканевой жидкости вещества могут проникать через покровы или осмотически или путем абсорбции. Аминокислоты довольно быстро проходят в гемолимфу и активность последней всегда вначале выше, чем в других исследуемых частях личинки. Основные процессы обмена веществ, вероятно, и протекают в гемолимфе. При последующей инкубации происходит накопление активности в средней кишке. Отмывание личинок от метки обнаруживает пик активности приблизительно через 30 мин.—1 час. после начала отмывания (рис. 4, 5). Мы объясняем это обстоятельство тем, что процесс идет в живой системе, которая обладает определенной степенью инерции и поэтому выведение метки происходит не плавно. Длительная инкубация (48 час.) и последующее отмывание (рис. 4) показывают, что метка в средней кишке достаточно стабильна. Это позволяет предположить, что в содержимом средней кишки кумулируются определенные вещества. Этим веществом, вероятно, и является высокоактивная протеаза, проявляющая затем свое действие при образовании свища (Белинская и др., 1971). Мы не наблюдали избирательности в проникновении различных аминокислот. Или такой избирательности вообще нет, или тут дело в том, что лейцин и метионин являются незаменимыми для личинок оводов аминокислотами (Kasting and Mc. Linnis, 1966), а глицин, являясь самой простой аминокислотой, входит в состав почти всех белковых соединений. Попав в организм личинок, исследуемые аминокислоты ведут себя неодинаково. Так, метионин S^{35} имеет тенденцию к накоплению в гемолимфе, покровах и средней кишке (рис. 3). Для глицина C^{14} характерно накопление в средней кишке, стабилизация в покровах и уменьшение в гемолимфе, тогда как лейцин C^{14} накапливается во всех исследуемых тканях личинки. Однако эта тенденция не столь резко выражена, как у метионина S^{35} (рис. 1, 2). Таким образом, если избирательность по отношению к аминокислотам существует, то она проявляется не в момент проникновения в организм паразита, а в ходе биохимического синтеза, когда и выясняется потребность

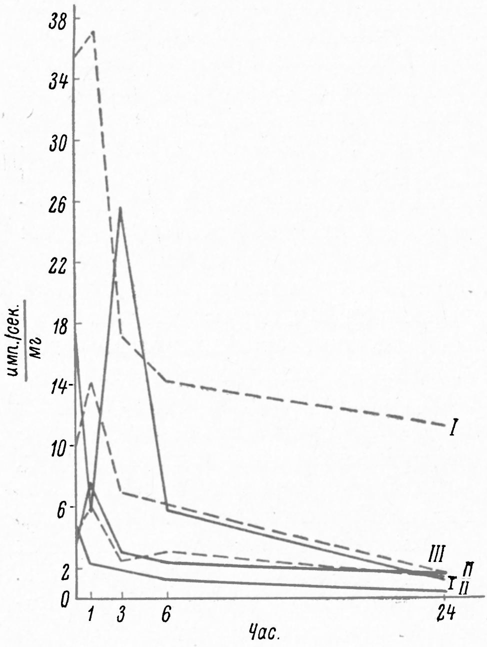

Рис. 4. Выведение радиоактивной метки (экспозиция 48 час.).

Сплошная линия — метионин S^{35}, *прерывистая* — глицин C^{14}. Остальные обозначения те же, что и на рис. 1.

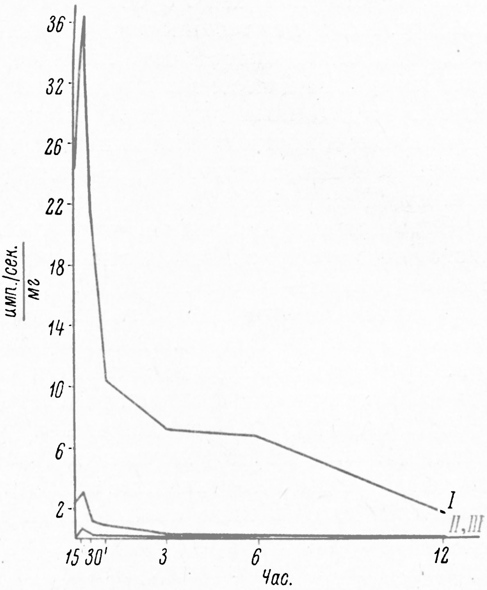

Рис. 5. Выведение радиоактивной метки. Лейцин C^{14} (экспозиция 30 мин.).

Обозначения те же, что и на рис. 1.

организма в той или иной аминокислоте и особенности метаболизма последних. Из всех приведенных аминокислот наиболее усвояемой является, вероятно, метионин S^{35}.

Высокий уровень радиоактивности, обнаруженный в покровах и гемолимфе личинок I стадии, и соответственно низкий уровень в средней кишке, в начале инкубации убедительно говорит о том, что метка входила в насекомых через покровы, попала в гемолимфу, а затем в конце концов попала в среднюю кишку. Наиболее убедительно это документирует третья серия опыта, когда личинки находились в изотопсодержащей среде 30 мин., а затем отмывались в чистой среде, и можно было проследить движение метки почти с момента ее поступления (рис. 5).

Автор приносит благодарность зав. лабораторией радиационной цитологии ЦИН АН СССР профессору Л. Н. Жинкину, научному сотруднику ЦИН АН СССР И. С. Амосовой за ценные советы и консультации, начальнику ОПВК ЛМК им. С. М. Кирова А. А. Кузьмину за предоставление возможности сбора личинок подкожного овода.

Литература

Александров В. Я. 1934. Проницаемость хитина некоторых личинок Diptera и метод ее изучения. Биол. журн., 3 (3) : 490—506.

Белинская В. З., Третьяков А. В. и Янушка А. Л. 1971. О содержимом средней кишки личинок I стадии овода Hypoderma bovis De Geer. Паразитол., 5 (1) : 20—25.

Бреев К. А. 1967. Новые данные о миграции личинок I стадии Hypoderma bovis De Geer в организме хозяина. Паразитол. сб. ЗИН АН СССР, 23 : 191—220.

Ильинская М. И. 1946. Механизм действия инсектицидов и проницаемость кутикулы насекомых. ДАН СССР, 51 (7) : 555—557.

Морозов С. Ф. 1935. Механизм проникновения контактных инсектицидов. Защита растений, 6 : 38—57.

Овчинникова И. М. 1960. Проницаемость покровов личинок щелкунов как показатель отношения их к экологическим факторам. Автореф. дисс. на соиск. уч. ст. канд. биол. наук : 1—22.

Скворцов А. А. 1946. Проницаемость покровов насекомых в отношении контактных инсектицидов. Усп. совр. биол., 21 (2) : 38—43.

Beesley W. N. 1966. The Use in Britain of Systemic Insecticides for the Control of Hypoderma (Diptera : Oestridae). Veter. Med. Rev., 1 : 37—48.

Brauer F. 1863. Monographie der Oestriden. Wien : 1—292.

Chamberlain W. F., Barnett C. C. and Graham O. H. 1969. Integumental Adsorption versus orae Ingestion of Phosphate and other Materials by Common Cattle Grubs held in vitro. Ann. ent. Soc. Amer., 62 (4) : 543—846.

Dennel R. 1945. Insect epicuticle. Nature, 155 : 545.

Eidmann H. 1922. Die Durchlässigkeit des Chitins bei osmotischen Vorgängen. Biol. Zentrbl., 42 : 429—435.

Enigk K. u. Pfaff W. 1954. Bau und Zusammensetzung der Larvencuticula von Hypoderma bovis (Oestridae). Zeitschr. Morph. u. Ökol. d. Tiere, 43 (2) : 124—153.

Gebauer O. 1941. Beobachtungen und Betrachtungen zum Jahreszyklus der beiden Dasselfliegen des Rindes. Zeitschr. f. Infektionskrankh., Parasitenkrankh. u. Hyg. der Haustiere, 56 (3) : 207—228.

Kasting R. and Linnis A. J. Mc. 1966. Amino Acid Requirements of Hypoderma bovis (L.), determined with Glucose- u-C^{14}. Exp. Parasit., 19 (3) : 249—253.

Kennaugh J. 1965. Pore Canals in the Cuticle of Hypoderma bovis (Diptera). Nature, 205 (967) : 207.

Koorevaar P. 1899. The larval stage of Hypoderma bovis. Annals a. Magazine Natur. History, 4, 7 series (19) : 69—73.

Wigglesworth V. 1945. Transpiration through the cuticle of insects. J. exp. Biol., 21 : 97—114.

Wolfe J. S. 1959. Observations on the histopathological changes caused by the larvae of Hypoderma bovis (L.) and Hypoderma lineatum (De Vill.) (Diptera : Oestridae) in tissues of cattle. Canad. Journ. Animal Sci., 39 (2) : 145—157.

PERMEABILITY OF FIRST-STAGE LARVAE OF HYPODERMA BOVIS DE GEER INTEGUMENT FOR AMINO ACIDS TAGGED WITH RADIOACTIVE ISOTOPES

V. Z. Belinskaya

SUMMARY

Integument of first-stage larvae of *Hypoderma bovis* possesses a certain degree of permeability for amino acids (glycine, leucine, methionine) in particular. The character of accumulation of radioactive tag suggests the selectivity of distribution of the above amino acids. The midgut content of first-stage larvae possesses cumulative properties.